Experimentelle Untersuchungen zur Hyaluronidasehemmung durch Ergotamintartrat, Protaminsulfat und Avil

Egbert Ingo Loenicker

1962

Aus der medizinischen Poliklinik der Universität München

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR HYALURONIDASEHEMMUNG DURCH ERGOTAMINTARTRAT, PROTAMINSULFAT UND AVIL

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der ganzen Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Egbert Ingo Loenicker

aus

München

1962

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Referent: Prof. Dr. W. Seitz

Dekan: Prof. Dr. W. Seitz

Tag der Mündlichen Prüfung: 31. VII. 1962

UNI-Druck, München 13, Amalienstraße 85

GEWIDMET

MEINEN LIEBEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Problematik	1
Eigene Untersuchungen	3
a) Methodik	3
b) Versuchsreihen	4
c) Berechnung der prozentualen Hemmung	15
d) Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse	20
Diskussion	39
Zusammenfassung	41
Literaturverzeichnis	42

PROBLEMATIK

In früheren Arbeiten haben Mathies und Mitarbeiter [1-10] wahrscheinlich machen können, daß die Wirkung in vivo hyaluronidasehemmender Substanzen an eine Nebennierenmarkfunktion mit Ausschüttung von Katecholaminen gebunden ist. Im einzelnen haben die mit der gleichen Methodik wie in der vorgelegten Arbeit durchgeführten Versuche gezeigt, daß die Hemmung des Hyaluronidasespreadings bei adrenalektomierten Ratten ausbleibt, dagegen bei hypophysektomierten Tieren erhalten ist. Diese Ergebnisse besagen zunächst, daß die Anwesenheit der Nebenniere für das Zustandekommen des hyaluronidasehemmenden Effektes erforderlich ist. Die Annahme einer über die Nebennierenrinde laufenden Wirkung hyaluronidasehemmender Stoffe hat sich nicht bestätigt. Nach Domenjoz [11] und Mathies [7] konnte eine Ascorbinsäuredepletion der Nebenniere unter hyaluronidasehemmenden Substanzen zwar nachgewiesen werden, diese bleibt jedoch bei hypophysektomierten Tieren aus, obwohl der hyaluronidasehemmende Effekt erhalten ist.

Da nach Sayers und Sayers [12] der Ascorbinsäuredepletionseffekt als Kriterium einer Nebennierenrindenaktivierung anzusehen ist, aktivieren also die hyaluronidasehemmenden Stoffe zwar die Nebennierenrinde, dieser Effekt kann aber für das Auftreten der hyaluronidasehemmenden Wirkung nicht verantwortlich gemacht werden. Es wurde daher angenommen, daß der hyaluronidasehemmende Effekt an eine Nebennierenmarkfunktion gebunden ist. Diese Annahme wurde durch Untersuchungen von Mathies und Mitarbeitern [10, 13] gestützt, nach denen die Nebennierenmark-Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin im Experiment bei intravenöser Applikation nicht nur bei intakten, sondern auch bei adrenalektomierten Tieren eine Hyaluronidasehemmung gleicher Größenordnung hervorrufen. Weiter haben Mathies, Glück, Poulantzas und Schmidt [13] zeigen können, daß die Wirkung hyaluronidasehemmender Stoffe und auch des Adrenalins und Noradrenalins hinsichtlich ihres hyaluronidasehemmenden Effektes durch Adrenolytika blockiert werden kann. Nach Arbeiten von Mathies [10] und Scheufele [14] sowie Mathies und Schlierf [15], die mit differenzierten Versuchsanordnungen durchgeführt wurden, wurde gezeigt, daß der hyaluronidasehemmende Effekt des Adrenalins und Nora-

drenalins keine primäre Katecholaminwirkung darstellt. Es war vielmehr anzunehmen, daß durch die Katecholaminfreisetzung beziehungsweise eine experimentelle Katecholamininjektion eine Reaktionskette in Gang gesetzt wird, die letztlich die Hyaluronidasehemmung bedingt und an der vermutlich weitere körpereigene Substanzen beteiligt sind. Von Mathies und Mitarbeitern [16-18] wurde diesbezüglich Heparin und Histamin untersucht, deren hyaluronidasehemmender Effekt bekannt war beziehungsweise nachgewiesen wurde. Es konnte gezeigt werden, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung des Heparins durch das heparininaktivierende Protaminsulfat und die des Histamins durch ein Antihistaminicum (Avil) blockiert wird, beziehungsweise in einigen Versuchsreihen sogar eine aktivierende Wirkung zeigt. Weiter konnte der hyaluronidasehemmende Effekt des Adrenalins und Noradrenalins sowohl durch Protaminsulfat als auch durch Avil aufgehoben werden [19-23]. Auch der Effekt der geprüften hyaluronidasehemmenden Stoffe (Natriumsalizylat, Phenylbutazon, Prednisolon, Östronsulfat und Moorbäder) wird sowohl durch Protaminsulfat als auch durch Avil aufgehoben. Diese Versuchsergebnisse lassen die Mitwirkung des Heparins und des Histamins am Wirkungsablauf hyaluronidasehemmender Substanzen diskutieren.

Nicht bekannt ist bisher der Einfluß der genannten blockierenden Stoffe (Ergotamintartrat, Protaminsulfat, Avil) auf das Hyaluronidasespreading. Nur wenn diese keine Steigerung der Hyaluronidaseaktivität zeigen, kann die Aufhebung des Effektes hyaluronidasehemmender Substanzen als echte Blockadewirkung angesehen werden.

Es wurde deshalb versucht, in der vorgelegten Arbeit diese noch offen stehende Frage zu klären. Dabei wurden bei der Applikation des Ergotamintartrats beziehungsweise Protaminsulfats beziehungsweise Avils die Dosen und diejenige Applikationsweise zugrunde gelegt, wie sie bei den erwähnten Blockadeversuchen von Mathies und Mitarbeitern [13, 19-23] angewandt wurden.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

a) METHODIK

Bei den Versuchsreihen wurden intakte männliche weiße Zuchtratten im Gewicht von 160 - 210 Gramm verwendet. Zur Durchführung der Versuche wurden die Tiere mit Evipan narkotisiert, dabei wurden bis zu 30 mg Evipannatrium (gelöst in physiologischer Kochsalzlösung) pro 100 g Tier subcutan injiziert, wobei, wie Wilhelmi[24] nachgewiesen hat, kein störender Einfluß auf die Hyaluronidaseaktivität zu erkennen ist.

Die Hyaluronidasehemmung wurde durch die Anwendung des Spreadingtestes gemessen und errechnet. Zunächst wurden in die mit Pilca enthaarte Bauchhaut streng intracutan je eine Quaddel von 0,1ccm einer 0,6%igen Evans-Blue-Lösung und 0,1ccm einer Evans-Blue-Hyaluronidaselösung gesetzt. Die Farbstoffhyaluronidaselösung wurde in der Weise hergestellt, daß eine Trockenampulle Hyaluronidase, enthaltend 150I.E., in 2 ccm der 0,6%igen Evans-Blue-Lösung aufgelöst wurde. Bei der Injektion von 0,1 ccm Farbstoffhyaluronidaselösung kamen also jeweils 7,5 I.E. zur Wirkung.

Das Setzen der Quaddeln wurde mit einer dünnen Kanüle (V2A 20) genau intracutan vorgenommen, 10 Minuten nachher wurde die Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff (Evansblue) - sowie der Farbstoffhyaluronidasequaddel an der erreichten Ausbreitung festgehalten, indem die Begrenzung der Quaddeln markiert und dann auf vorbereitete Zelluloidstreifen übertragen wurde. Die Fläche der Quaddeln wurde planimetrisch bestimmt.

Nach der subcutanen (Ergotamintartrat) beziehungsweise intravenösen (Protaminsulfat, Avil) Injektion wurden zu verschiedenen Zeiten erneut mit den oben genannten Farbstoff- und Farbstoffhyaluronidaselösungen Quaddelpaare gesetzt und jeweils nach 10 Minuten wie erwähnt abgelesen.

Nach Madinaveitia[25] ist nur die in den ersten 10 Minuten ablaufende Reaktion des zweiphasig verlaufenden Spreadings sicher ein Hyaluronidaseeffekt.

Gibian[26] nimmt an, daß die durch die Hyaluronidase verstärkt auftretende Diffusion einer Intracutanquaddel auf dem Druck beruht, den das Flüssigkeitsdepot auf seine Umgebung ausübt. Nach den ersten 10 Minuten dürften sich dann im wesentlichen nur mehr Resorptionsmechanismen abspielen.

Während des Versuches mußte beachtet werden, daß die Tiere stets gleichmäßig narkotisiert sind, da sonst die Ausbreitung der Quaddeln beeinträchtigt wurde. (Beginnen die Tiere unruhig zu werden, so soll nur mit Evipan nachnarkotisiert werden.) Um nachteilige Einflüsse auf das Spreading zu verhindern, war es wichtig, daß die normale Körpertemperatur der Tiere während des ganzen Versuches gleichmäßig erhalten blieb.

b) VERSUCHSREIHEN

A. Versuche mit Ergotamintartrat

1. Versuchsreihe

Zunächst wurden bei intakten männlichen weißen Ratten in die mit Pilca enthaarte Bauchhaut (obere Grenze Rippenbogen) streng intracutan eine Farbstoffquaddel und eine Farbstoffhyaluronidasequaddel gesetzt.

Die Zusammensetzung und Konzentration der Lösungen (Evans-Blue- beziehungsweise Evans-Blue-Hyaluronidase-Lösung) wurden wie oben angegeben gewählt.

Nach 10 Minuten wurde die Ausbreitung der Quaddelpaare markiert. Sodann wurden subcutan 0, 8 mg Ergotamintartrat (Gynergen Sandoz 0, 5 mg Amp.) injiziert.

Nach 15 Minuten wurde erneut in der oben angegebenen Weise ein Quaddelpaar gesetzt, das ebenfalls nach 10 Minuten abgelesen wurde. Nach 60 Minuten wurde der gleiche Vorgang wiederholt.

Am Ende des Arbeitsganges wurden die Konturen aller Quaddeln auf vorbereitete Zelluloidstreifen übertragen und planimetrisch ausgewertet. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 1, Abbildung 1 und 4.

2. Versuchsreihe

Zunächst war der Arbeitsgang gleich dem der ersten Versuchsreihe, nur wurden jetzt 30 bzw. 75 Minuten nach der Ergotamininjektion das 2. und 3. Quaddelpaar gesetzt. Die Ergebnisse zeigen Tabelle 2, Abbildung 1 und 4.

3. Versuchsreihe

Bei gleicher Methodik wurden die Quaddelpaare a.i., sowie 45 bzw. 90 Minuten p.i. gesetzt. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 3, Abbildung 1 und 4.

Bei allen 3 Versuchsreihen war eine Nachnarkotisierung mit Evipan nötig. Im allgemeinen wurde das Medikament von den Tieren gut vertragen.

B. Versuche mit Protaminsulfat

1. Versuchsreihe

Nachdem wie bei den vorigen Versuchsreihen das erste Quaddelpaar markiert war, wurde jeweils die vena femoralis dicht unter der Schenkelbeuge freigelegt. Sodann wurden 1,5 mg Protaminsulfat pro Tier intravenös injiziert. (Protaminsulfat 5 ccm Amp. im Verhältnis 3 : 7 mit phys. NaCl-Lsg. verdünnt.) 15 und 30 Minuten danach wurden die weiteren Quaddelpaare gesetzt. Die Ergebnisse zeigen Tabelle 4 und Abbildungen 2 - 4.

2. Versuchsreihe

Bei gleicher Methodik wurden das zweite und dritte Quaddelpaar 45 und 60 Minuten p.i. gesetzt. (Ergebnisse Tab. 5, Abb. 2 - 4)

Die Verträglichkeit des Protaminsulfates bei den Tieren war nicht so gut, die Sterblichkeitsziffer relativ hoch.

C. Versuche mit Avil

1. Versuchsreihe

Bei gleicher Methodik wurden 5 mg Avil pro 100 g Tier ebenfalls intravenös injiziert. Avil (50 mg in 2 ccm-Amp.) wurde im Verhältnis 2 : 3 mit phys. NaCl-Lsg. verdünnt verwendet. Nach 15 bzw. 60 Minuten wurden das 2. und 3. Quaddelpaar gesetzt. Die Ergebnisse zeigen Tabelle 6, Abbildung 3, 4.

2. Versuchsreihe

Gleiche Methodik. Die Hyaluronidasehemmung wurde 30 und 75 Minuten nach der Avilapplikation wie angegeben bestimmt. Die Ergebnisse zeigen Tabelle 7, Abbildung 3 und 4.

3. Versuchsreihe

Ebenfalls gleiche Methodik. Die Hyaluronidasehemmung wurde 45 und 90 Minuten p.i. bestimmt. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 8, Abbildung 3 und 4.

Bereits während der Avilinjektion war bei den Tieren in üblicher Narkosetiefe eine heftige Excitation zu bemerken, die während des ganzen Arbeitsganges anhielt. Es war deshalb nötig, die Tiere vor jeder Injektion in eine tiefe Narkose zu bringen, um das Spreading nicht zu beeinträchtigen.

VERSUCHSREIHE MIT ERGOTAMINTARTRAT (GYNERGEN)

0,8 mg pro 100 g Tier subcutane Injektion.

Tier Nr.	Gewicht	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel	Gewicht	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel
		vor		15 Minuten nach			vor		60 Minuten nach	
		Ergotamintartratinjektion					Ergotamintartratinjektion			
1	205	125	235	122	189	205	125	235	122	217
2	150	135	245	137	195	150	135	245	137	215
3	165	172	292	170	258	165	172	292	168	288
4	175	139	250	133	237	175	139	250	140	244
Mittelwerte		142,75	255,5	140,5	219,7		142,75	255,5	140,5	241

Tabelle 1

VERSUCHSREIHE MIT ERGOTAMINTARTRAT (GYNERGEN)

0, 8 mg pro 100 g Tier subcutane Injektion

Tier Nr.	Gewicht	Farbstoff-quaddel	F. Hy' ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	F. Hy' ase-quaddel	Gewicht	Farbstoff-quaddel	F. Hy' ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	F. Hy' ase-quaddel
		vor		30 Minuten nach			vor		75 Minuten nach	
		Ergotamintartratinjektion					Ergotamintartratinjektion			
1	175	133	230	131	193	175	133	230	132	212
2	165	155	237	157	202	165	155	237	155	240
3	185	143	234	138	221	185	143	234	139	230
4	165	150	310	150	275	165	150	310	158	280
Mittelwerte		145, 25	252, 75	144	222, 75		145, 25	252, 75	146	240, 5

Tabelle 2

VERSUCHSREIHE MIT ERGOTAMINTARTRAT (GYNERGEN)

0,8 mg pro 100 g Tier subcutane Injektion.

Tier Nr.	Gewicht	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel	Gewicht	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel
		vor		45 Minuten nach			vor		90 Minuten nach	
		Ergotamintartratinjektion					Ergotamintartratinjektion			
1	205	145	252	155	213	205	145	252	148	234
2	175	137	257	141	250	175	137	257	137	249
3	175	149	248	152	222	175	149	248	139	240
4	185	149	262	152	251	185	149	262	152	261
5	175	150	250	152	239	175	150	250	149	245
Mittelwerte		146,0	253,8	150,4	235,0		146,0	253,8	145,0	245,8

Tabelle 3

VERSUCHSREIHE MIT PROTAMINSULFAT

1,5 mg pro Tier intravenöse Injektion

Tier Nr.	Gewicht	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel	Gewicht	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel
		vor		15 Minuten nach			vor		30 Minuten nach	
		Protaminsulfatinjektion					Protaminsulfatinjektion			
1	165	155	285	153	250	165	155	285	152	260
2	175	157	248	152	218	175	157	248	152	228
3	160	162	282	162	250	160	162	282	159	256
4	165	158	290	148	258	165	158	290	155	271
5	155	160	285	168	250	155	160	285	160	263
6	155	158	291	145	259	155	158	291	155	273
Mittelwerte		158,33	280,16	153,66	247,5		158,33	280,16	155,5	258,5

Tabelle 4

VERSUCHSREIHE MIT PROTAMINSULFAT

1,5 mg pro Tier intravenöse Injektion

Tier Nr.	Gewicht	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel	Gewicht	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel
		vor		45 Minuten nach			vor		60 Minuten nach	
		Protaminsulfatinjektion					Protaminsulfatinjektion			
1	175	166	290	165	278	175	166	290	166	295
2	160	150	258	152	250	160	150	258	148	252
3	195	162	245	158	235	195	162	245	157	240
4	165	162	288	158	275	165	162	288	160	290
5	165	158	292	150	278	165	158	292	154	288
6	165	155	285	158	270	165	155	285	160	290
Mittelwerte		158,83	276,33	156,83	264,33		158,83	276,33	157,50	275,83

Tabelle 5

VERSUCHSREIHE MIT AVIL

5 mg pro 100 g Tier intravenöse Injektion

Tier Nr.	Gewicht	Farbstoff-quaddel	F. Hy' ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	F. Hy' ase-quaddel	Gewicht	Farbstoff-quaddel	F. Hy' ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	F. Hy' ase-quaddel
		vor		15 Minuten nach			vor		60 Minuten nach	
		Avilinjektion					Avilinjektion			
1	195	141	280	139	190	195	141	280	137	215
2	190	145	275	143	188	190	145	275	143	211
3	165	147	280	146	191	165	147	280	145	229
4	185	150	278	148	189	185	150	278	145	212
5	200	150	282	148	194	200	150	282	147	215
Mittelwerte		146, 6	279, 0	144, 8	190, 4		146, 6	279, 0	143, 4	216, 4

Tabelle 6

5 mg pro 100 g Tier intravenöse Injektion

Tier Nr.	Gewicht	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel	Gewicht	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	F.Hy'ase-quaddel
		vor		30 Minuten nach			vor		75 Minuten nach	
		Avilinjektion					Avilinjektion			
1	195	150	285	142	212	195	150	285	145	245
2	190	155	285	155	217	190	155	285	152	251
3	160	162	282	155	223	160	162	282	152	243
4	170	150	265	152	195	170	150	265	155	226
5	175	145	275	150	205	175	145	275	142	241
Mittelwerte		152,4	278,4	150,8	210,4		152,4	278,4	149,2	241,2

Tabelle 7

VERSUCHSREIHE MIT AVIL

5 mg pro 100 g Tier intravenöse Injektion

Tier Nr.	Gewicht	Farbstoff-quaddel	F. Hy' ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	F. Hy' ase-quaddel	Gewicht	Farbstoff-quaddel	F. Hy' ase-quaddel	Farbstoff-quaddel	F. Hy' ase-quaddel
		vor		45 Minuten nach			vor		90 Minuten nach	
		Avilinjektion					Avilinjektion			
1	200	152	277	150	208	200	152	277	148	258
2	210	145	278	148	210	210	145	278	145	253
3	160	149	277	142	209	160	149	277	150	250
4	155	148	280	150	220	155	148	280	152	256
5	170	145	280	147	217	170	145	280	143	257
Mittelwerte		147, 8	278, 4	147, 4	212, 8		147, 8	278, 4	147, 6	254, 8

Tabelle 8

c) BERECHNUNG DER PROZENTUALEN HEMMUNG

Zur Berechnung der prozentualen Hemmung des Hyaluronidasespreadings wurde die Flächenausbreitung der Farbstoff- und Hyaluronidasequaddel vor Gabe der zu untersuchenden Substanzen einer 0%igen Hemmung gleichgesetzt. Die reine Farbstoffquaddel vor dem Versuch entspricht einer 100%igen Hemmung, da eine Farbstoff-Hyaluronidasequaddel mit vollständig gehemmter Hyaluronidaseaktivität die gleiche Größe aufweisen würde, wie die Farbstoffquaddel ohne Hyaluronidasezusatz. Auf diese beiden Festpunkte wurde die Flächenausbreitung der Farbstoff- und Farbstoff-Hyaluronidasequaddel zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation der zu untersuchenden Stoffe bezogen und daraus die jeweilige Hemmung in Prozent nach der Formel

$$\frac{(\text{F.Hy' asequaddel vor I.} - \text{F.Hy' asequaddel p.i.}) \times 100}{\text{F.Hy' asequaddel vor} - \text{Farbstoffquaddel vor}} = \begin{matrix}\text{Hem-}\\ \text{mung}\\ \text{in \%}\end{matrix}$$

errechnet.

Die Farbstoffquaddel nach Gabe der zu untersuchenden Substanzen ist in dieser Berechnung nicht berücksichtigt. Sie dient zur statistischen Feststellung, inwieweit auch die reine Farbstoffquaddel eine Veränderung ihrer Ausbreitung erfährt. Danach ist die Aussage erlaubt, ob eine hemmende oder fördernde Einwirkung auf das Spreading spezifisch auf die Hyaluronidasewirkung bezogen werden kann.

ERGOTAMINTARTRAT

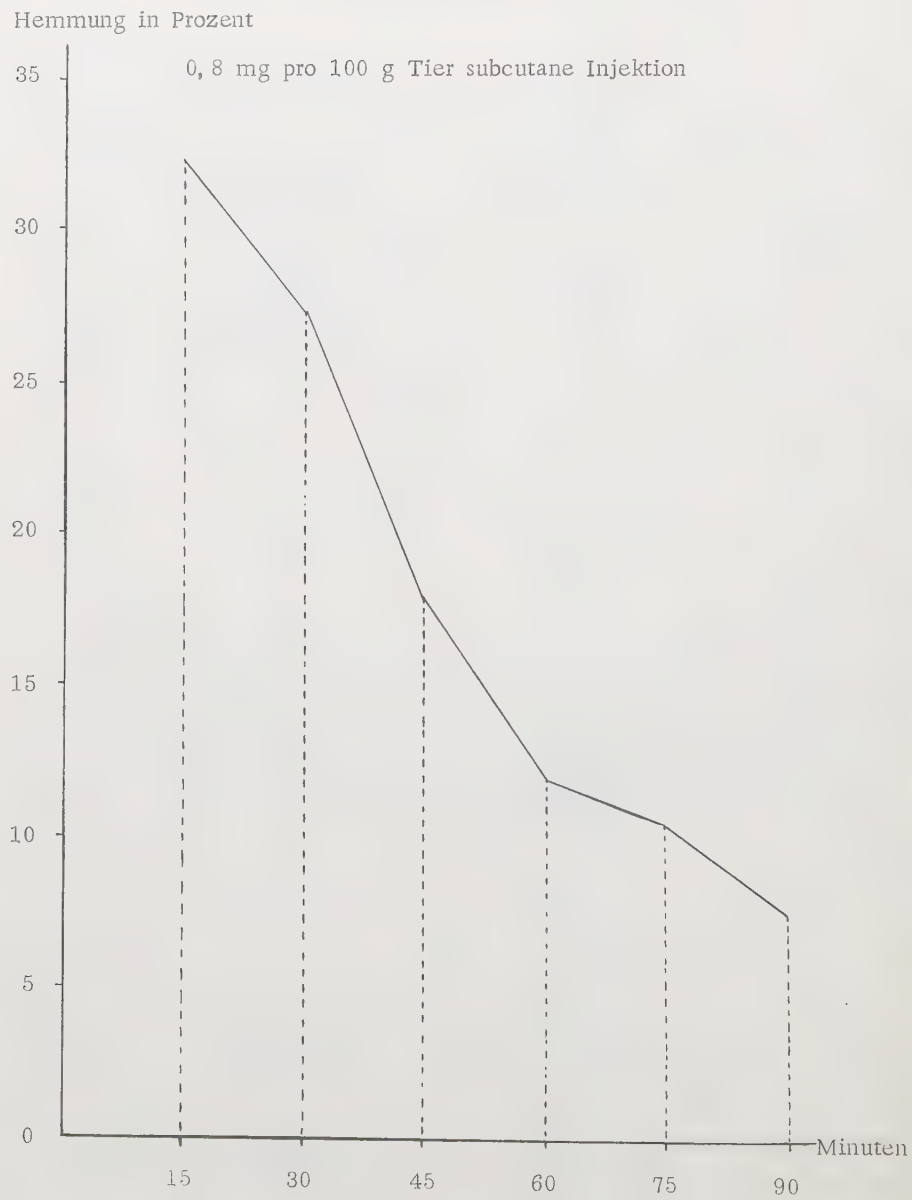

Abb. 1

PROTAMINSULFAT

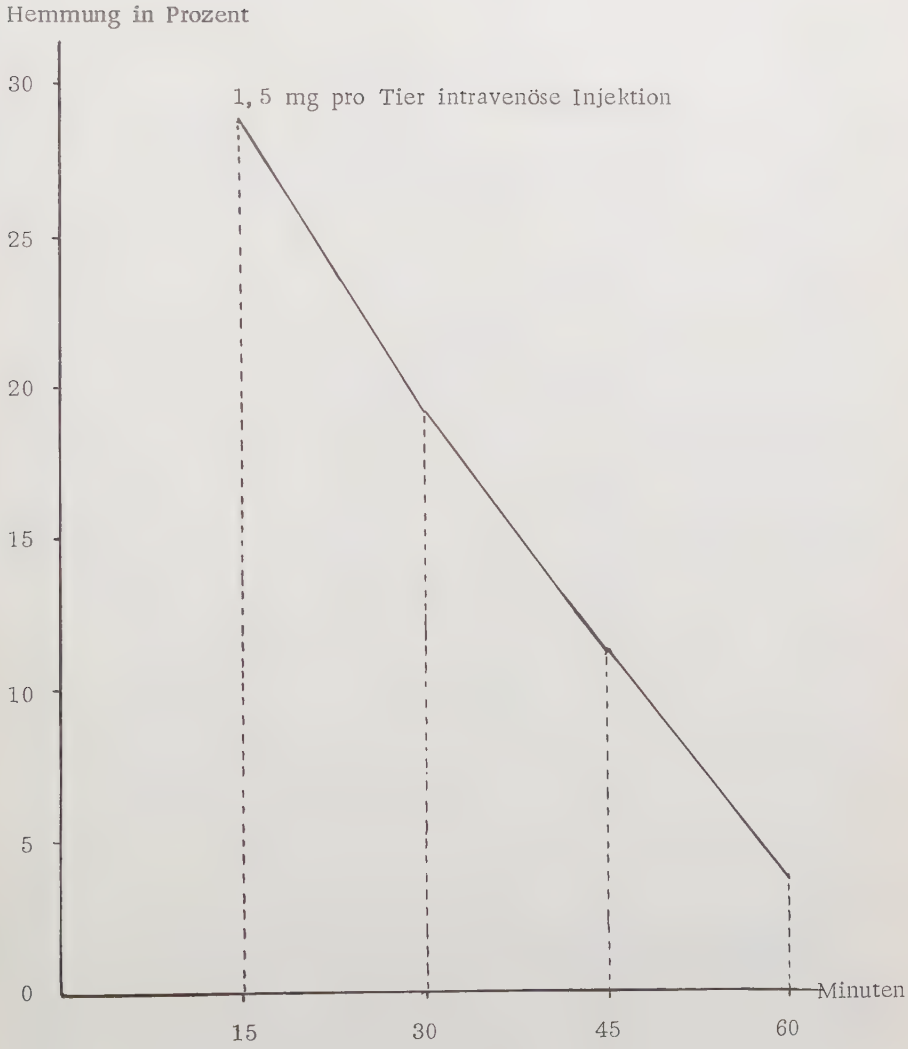

Abb. 2

AVIL

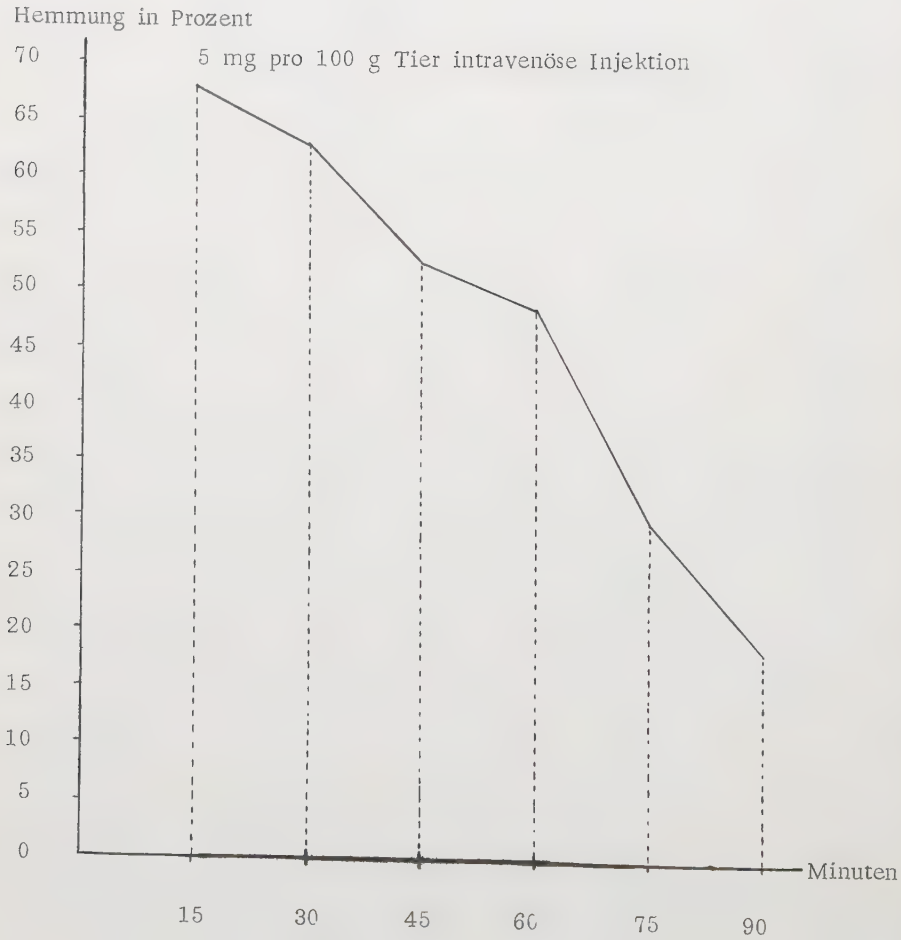
Hemmung in Prozent
5 mg pro 100 g Tier intravenöse Injektion
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
15
30
45
60
75
90
Minuten

Abb. 3

VERGLEICH DER PROZENTUALEN HEMMUNGEN BEI INJEKTIONEN VON ERGOTAMINTARTRAT, PROTAMINSULFAT UND AVIL

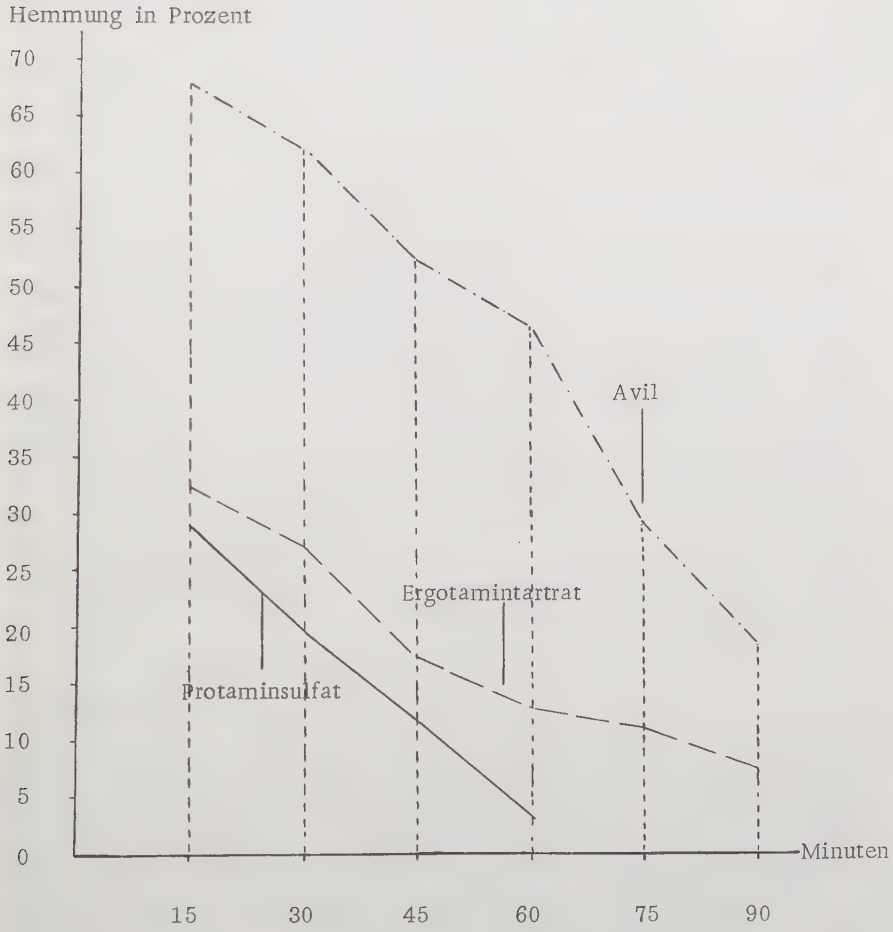

Abb. 4

d) STATISTISCHE AUSWERTUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE

1. Statistisches Modell und Methodik

Primäre Aufgabe der statistischen Auswertung von Versuchsergebnissen ist es, die Gesamt-Variabilität der beobachteten Werte in zwei Haupt-Komponenten zu zerlegen, und zwar in eine Komponente, die durch systematische Faktoren bedingt ist und eine andere Komponente, welche die experimentelle Variabilität darstellt. Diejenige Komponente der Gesamt-Variabilität, die durch systematische Faktoren bedingt ist, muß selber noch in so viele Komponenten zerlegt werden, als systematische Faktoren bei dem betreffenden Versuch zu berücksichtigen sind.

Im Falle der vorliegenden Versuche muß prinzipiell mit zwei systematischen Faktoren gerechnet werden, nämlich einmal dem Einfluß des jeweiligen Versuchstieres und zum anderen dem Einfluß der jeweiligen Versuchszeit, zu der die Hyase-Aktivität bestimmt wurde. Die Erfahrung bei der Auswertung früherer Versuche, insbesondere bei der Auswertung methodischer Versuche hatte gezeigt, daß man diesen systematischen Einflüssen am besten gerecht wird, wenn man der statistischen Auswertung ein lineares Modell zugrunde legt. Bezeichnet man einen Meßwert, der an dem Versuchstier V zu dem Zeitpunkt t des Versuches bestimmt wurde mit

$$x(V;t),$$

so wird bei diesem Modell angenommen, daß sich dieser Meßwert in der nachstehenden Form darstellen läßt:

$$x(V;t) = a_V + b_t + \varepsilon.$$

Die beiden Größen a_V bzw. b_t dieses Ausdruckes sind hierbei konstante Parameter, die nur von dem jeweiligen Versuchstier bzw. nur von der jeweiligen Versuchszeit abhängen und außerdem voneinander unabhängig sind. Diese beiden Parameter bringen den systematischen Einfluß des jeweiligen Versuchstieres bzw. der jeweiligen Versuchszeit auf den Meßwert zum Ausdruck. Die Größe ε dagegen ist der Ausdruck desjenigen Anteils der Variabilität der Meßwerte, der durch zufällige Einflüsse bedingt ist und den wir weiterhin mit "experimentelle Variabilität" bezeichnen. Das angegebene Modell ist nur dann vollständig, wenn man über die Größe ε noch gewisse Voraus-

setzungen macht. Diese lauten dahingehend, daß ε eine normalverteilte Zufallsvariable ist, mit dem Erwartungswert 0 und einer Varianz σ^2, die nur von der Versuchsanordnung, jedoch nicht von dem jeweiligen Versuchstier bzw. von der jeweiligen Versuchszeit abhängt.

Aufgabe der statistischen Auswertung ist es, nach Festlegung des statistischen Modelles, optimale Schätzungen für die Parameter, die in das Modell eingehen und für die experimentelle Variabilität zu ermitteln. Dies geschieht im vorliegenden Falle nach der"Methode der kleinsten Quadrate", wobei die experimentelle Variabilität mit Hilfe einer zweifachen Varianz-Analyse geschätzt wird. In den Varianz-Analysen ergibt sich diese Schätzung als "Rest-Varianz".

Hinsichtlich der Schätzung der Parameter sei hier nur erwähnt, in welcher Weise die Parameter b_t, die zu den verschiedenen Zeitpunkten t des Versuches gehören, geschätzt werden. Es bedeutet hierzu $\bar{x}(t)$ das arithmetische Mittel aus allen Meßwerten, die zu dem Zeitpunkt t an sämtlichen Versuchstieren einer Versuchsreihe beobachtet wurden. Bei passender Normierung der individuellen Konstanten a_v der einzelnen Versuchstiere, ist dann $\bar{x}(t)$ eine optimale Schätzung im Sinne der "Methode der kleinsten Quadrate" für die zum Zeitpunkt t gehörige Konstante b_t. Innerhalb einer Versuchsreihe liegt eine Veränderung der Hyase-Aktivität bzw. der Diffusionsgeschwindigkeit einer Quaddel nur dann vor, wenn die zu verschiedenen Zeiten gehörigen Parameter b_t sich voneinander unterscheiden. Zur statistischen Prüfung der Frage, ob in einer Versuchsreihe eine solche Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit vorliegt, war daher zu prüfen, ob die beobachteten Meßwerte mit der Hypothese verträglich sind, daß die zu den verschiedenen Zeitpunkten des Versuches gehörigen Parameter b_t untereinander gleich sind. Trifft dies nicht zu, so kann als statistisch gesichert gelten, daß während der Versuchsreihe eine Änderung in der Diffusionsgeschwindigkeit auftritt.

Bei der vorliegenden Versuchsanordnung wird die oben genannte Hypothese am zweckmäßigsten mit Hilfe einer zweifachen Varianz-Analyse geprüft, wobei die "Varianz zwischen Versuchsstufen", die sich hierbei ergibt, ein Maß für die Abweichung des experimentell beobachteten Sachverhaltes von der zu prüfenden Hypothese darstellt. Ist diese Varianz-Komponente statistisch gesichert größer als die Schätzung der experimentellen Variabilität, die sogenannte Rest-Varianz, so ist die Prüfhypothese zu verwerfen, d.h. es liegt eine statistisch gesicherte Veränderung der Diffusionsgeschwindigkeit des jeweiligen Quaddel-Typus vor.

Der anderen in der Varianz-Analyse auftretenden Varianz-Komponente "Varianz zwischen den Tieren" kommt unmittelbar für die vorliegende Fragestellung keine Bedeutung zu. Sie drückt lediglich aus, in welcher Weise sich das "individuelle Reaktionsniveau" der einzelnen Versuchstiere voneinander unterscheiden. Ist sie statistisch wesentlich größer als die experimentelle Variabilität, so bedeutet dies, daß zu verschiedenen Versuchstieren verschiedene Parameter a_V gehören. Auf Grund des linearen Modelles kann der zu einem Versuchstier V gehörige Parameter a_V als das zu diesem Tier gehörige "individuelle Reaktionsniveau" gedeutet werden.

Liefert die Varianz-Analyse einen statistisch gesicherten Hinweis dafür, daß während einer Versuchsreihe eine Änderung in der Diffusionsgeschwindigkeit eingetreten ist, so folgt hieraus, daß mindestens zu einem Zeitpunkt nach Applikation der Prüfsubstanz die Diffusionsgeschwindigkeit sich gegenüber dem Ausgangswert statistisch gesichert verändert hat. Es ist dann zunächst weiter zu prüfen, in welcher Richtung diese Veränderung verlaufen ist, ob eine Vergrößerung oder eine Verminderung der Diffusionsgeschwindigkeit stattgefunden hat. Die Richtung der Veränderung kann dadurch ermittelt werden, daß man die Differenz zwischen dem zum Zeitpunkt t gehörigen Parameter b_t und dem Parameter b_0 berechnet, der zum Ausgangswert gehört. Selbstverständlich lassen sich aus den Versuchen nur Schätzwerte für diese Differenz ermitteln, diese Schätzwerte stellen sich in der Form der Mittelwertsdifferenz

$$\sigma\,\bar{x}(t) = \bar{x}(t) - \bar{x}(0)$$

dar, wobei $\bar{x}(0)$ derjenige Mittelwert ist, der zu dem unbeeinflußten Ausgangswert gehört. Eine Hemmung der Diffusionsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt t des Versuches gegenüber dem Ausgangswert liegt nur dann vor, wenn die zugehörige Mittelwertsdifferenz $\sigma\,\bar{x}(t)$ einen negativen Wert besitzt.

Bei allen denjenigen Versuchsreihen, bei denen die Varianz-Analyse eine gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit des jeweiligen Quaddel-Typus ergab, mußte noch geprüft werden, ob sich diese Veränderung gleichmäßig auf die beiden Quaddeln nach Applikation der Prüfsubstanz auswirkt und ob diese beiden Quaddeln sich selber untereinander unterscheiden. Dies geschieht mit Hilfe eines "orthogonalen Vergleiches", wobei zwei weitere Varianz-Komponenten ermittelt werden, die insgesamt die "Varianz zwischen Versuchsstufen ergeben. Es handelt sich hierbei um die Varianz-Komponente "zwischen Kontrolle und Versuchsstufe" und die Varianz-Komponente "zwischen Versuchszeiten". Mit Hilfe der ersten dieser beiden Va-

rianz-Komponenten wird geprüft, ob die Diffusionsgeschwindigkeit der beiden Quaddeln nach Applikation der Prüfsubstanz im Mittel sich von der Diffusionsgeschwindigkeit der Kontroll-Quaddeln vor Applikation der Substanz unterscheiden. Diese Varianz-Komponente wird wiederum mit der experimentellen Variabilität, d.h. mit der Rest-Varianz, verglichen; ist die Varianz-Komponente "zwischen Kontrollen und Versuchsstufen" gesichert größer als die Rest-Varianz, so bedeutet dies, daß im Mittel zu den beiden Zeitpunkten nach Applikation der Prüfsubstanz eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit vorliegt. Ist außerdem die Varianz-Komponente "zwischen Versuchszeiten" gesichert größer als die experimentelle Variabilität, d.h. die Rest-Varianz, so bedeutet dies, daß die Diffusionsgeschwindigkeit nach Applikation der Prüfsubstanz außerdem noch von dem Zeitpunkt ihrer Bestimmung abhängt.

Aus Gründen der experimentellen Technik konnten bei den vorliegenden Versuchen keine Doppelbestimmungen am gleichen Versuchstier zur gleichen Versuchszeit durchgeführt werden (auf Grund der beschränkten Größe der Bauchhaut der Versuchstiere); daher konnte die Richtigkeit des zugrunde gelegten statistischen Modells auch nicht unmittelbar mit Hilfe der vorliegenden Versuche geprüft werden. Dabei ist unter "Richtigkeit" eine angemessene Übereinstimmung zwischen den Werten, die auf Grund des statistischen Modelles erwartet werden müßten und denjenigen Werten, die tatsächlich beobachtet worden sind, zu verstehen. Immerhin gibt es eine Möglichkeit zumindest abzuschätzen, ob das gewählte Modell vernünftig ist. Hierzu wird folgendermaßen vorgegangen.

Die zum Zeitpunkt t einer Versuchsreihe an sämtlichen Versuchstieren gemessenen Werte weisen eine bestimmte Variabilität auf, als deren Maß wir die empirische Varianz $s^2(t)$ dieser Meßwerte ansahen. Wenn das gewählte statistische Modell den realen Sachverhalt in angemessener Weise wiedergibt, muß erwartet werden, daß die zu verschiedenen Zeiten gehörigen empirischen Varianzen $s^2(t)$ alles Schätzwerte der gleichen übergeordneten Varianz sind, d.h. daß sie untereinander homogen sein müssen. Ob diese Annahme zutrifft, kann mit Hilfe des BARTLETT-Tests geprüft werden. Bei allen Versuchsreihen wurde daher auch der BARTLETT-Test durchgeführt. Es sei jedoch bemerkt, daß es sich hier mehr um eine Plausibilitäts-Betrachtung handelt, als um einen exakten statistischen Test zur Prüfung der Richtigkeit des Modelles.

Abschließend sei bemerkt, daß die Auswertung der Ergebnisse für die reine Farbstoff-Quaddel und die Farbstoff-Hyase-Quaddel getrennt vorgenommen wurde, da die Erfahrung gezeigt hat, daß sich die beiden Quaddel-Typen in unterschiedlicher Weise verhalten. Das zugrundegelegte statistische Modell war jedoch in beiden Fällen das gleiche.

2. Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Das Ergebnis der durchgeführten Varianz-Analysen haben wir in den Tabellen 9 - 16 dargestellt. Es bedeutet in den Schemata der Varianz-Analysen:

- n: die Zahl der Freiheitsgrade der Varianz-Komponente;
- SAQ: das Summen-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
- MAQ: das Mittlere-Abstands-Quadrat der Varianz-Komponente;
- $F_{emp.}$: der Varianz-Quotient zwischen der jeweiligen Varianz-Komponente und der experimentellen Variabilität (Rest-Varianz);
- p: die Überschreitungswahrscheinlichkeit des Varianz-Quotienten $F_{emp.}$ in der zugehörigen F-Prüfverteilung.

Am Fuße jeder Varianz-Analyse ist das Ergebnis des BARTLETT-Tests angegeben, den wir zur Prüfung der Übereinstimmung zwischen dem gewählten Modell und dem realen Sachverhalt durchführten. Es bedeutet hierin "n" die Zahl der Freiheitsgrade der Chi-Quadrat-Verteilung, welcher die Prüfgröße $\chi^2_{emp.}$ genügt, wenn die Hypothese zutrifft, daß die verglichenen Varianzen $s^2(t)$ untereinander homogen seien.

Die Mittelwerte $\bar{x}(t)$ der zu jedem Zeitpunkt t an den Versuchstieren beobachteten Werte, die empirischen Varianzen $s^2(t)$ dieser Werte und die Mittelwertsdifferenzen $\sigma\,\bar{x}(t) = \bar{x}(t) - \bar{x}(0)$ finden sich in den Tabellen 17 - 19. Soweit sich aus den Varianz-Analysen ergeben hat, daß zwischen den Diffusionsgeschwindigkeiten zu verschiedenen Zeitpunkten einer Versuchsreihe statistisch gesicherte Unterschiede vorliegen, haben wir in diesen Tabellen auch das Ergebnis des orthogonalen Vergleiches angegeben. Hierzu wurde in der mit "Sicherung" überschriebenen Spalte angeführt, mit welcher Irrtumswahrscheinlichkeit behauptet werden kann, die betreffende Mittelwertsdifferenz $\sigma\,\bar{x}(t)$ sei gesichert von 0 verschieden. Nur wenn die-

se Irrtumswahrscheinlichkeit nicht größer als 5% ist, kann behauptet werden, daß zu dem betreffenden Zeitpunkt eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit des betreffenden Quaddel-Typus gegenüber dem Ausgangswert vor Applikation der Prüfsubstanz vorliegt. Eine ausreichende statistische Sicherung für diese Behauptung liegt allerdings erst dann vor, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit nicht größer als 1% ist.

Schließlich enthalten die Tabellen die in üblicher Weise berechnete prozentuale Hemmung für jeden Zeitpunkt des Versuches.

3. Diskussion der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Zunächst sei das Ergebnis des BARTLETT-Tests besprochen. Nur bei einer einzigen Versuchsreihe, nämlich der Versuchsreihe 3a) besitzt die Prüf-Größe $\chi^2_{emp.}$ des BARLETT-Tests eine Überschreitungswahrscheinlichkeit, die kleiner als 5% ist. Es kann sich hier einerseits um einen Verteilungseffekt der Prüfgröße handeln, wie er bei der Vielzahl der durchgeführten Tests - insgesamt wurde der Test 14 mal durchgeführt - durchaus einmal erwartet werden muß; andererseits fällt jedoch auf, daß die Ursache für die kleine Überschreitungswahrscheinlichkeit der Prüfgröße darin liegt, daß zum Zeitpunkt 60' p.i. von Avil die empirische Varianz s^2 (60) der Farbstoff+Hy'ase-Quaddel wesentlich größer ist als zu den anderen Zeitpunkten. Es liegt hier die Vermutung nahe, daß zu den späteren Zeiten der Versuchsreihe die Reaktion der Tiere auf die Versuchsanordnung nicht mehr so gleichmäßig ist wie zu den früheren. Andererseits läßt sich ein ähnlicher Effekt bei den übrigen Versuchsreihen mit Avil nicht feststellen, so daß es sich bei diesem Sachverhalt wohl primär um einen zufälligen Effekt handeln dürfte.

Eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der reinen Farbstoff-Quaddel läßt sich nur bei der Versuchsreihe 3a) nachweisen. Allerdings ist bei dieser Versuchsreihe die "experimtentelle Variabilität", d. h. die Rest-Varianz, so klein, daß bereits eine Mittelwertsdifferenz von $-2mm^2$ statistisch gesichert werden kann. Im Prinzip ist die Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der reinen Farbstoff- Quaddel bei dieser Versuchsreihe nicht wesentlich anders als bei den anderen Versuchsreihen.

Das Ergebnis der statistischen Auswertung über die Diffusionsgeschwindigkeiten der Farbstoff+Hy' ase-Quaddel soll nunmehr für die einzelnen Versuchsreihen getrennt besprochen werden.

Versuchsreihe 1:

Eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff+Hy' ase-Quaddel läßt sich bei dieser Versuchsreihe nur in den Teilversuchsreihen a) und c) nachweisen. Wie sich aus dem Vorzeichen der Mittelwertsdifferenz $\sigma_{\bar{x}}(t)$ ergibt, handelt es sich hierbei durchwegs um eine Hemmung der Hy' ase-Aktivität, deren Maximum zum Zeitpunkt 15' p.i. liegt. Ab diesem Zeitpunkt nimmt die Größe der Mittelwertsdifferenz $\sigma_{\bar{x}}(t)$ stetig ab; ihren kleinsten Wert nimmt sie zum Zeitpunkt 90' p.i. an. Der statistisch ungesicherte Wert zum Zeitpunkt 30' p.i. (Teilversuchsreihe b) schließt sich in seiner Größe gut an die gesicherten Werte 150' p.i. und 45 p.i. (Teilversuchsreihen a) und c)) an. Die Tatsache, daß er statistisch nicht gesichert werden konnte ist wesentlich dadurch bedingt, daß in dieser Versuchsreihe die experimtelle Variabilität, d.h. die Rest-Varianz, sehr groß ist. Allgemein fällt auf, daß in den Teilversuchsreihen a) und b) die experimentelle Variabilität wesentlich größer ist als auf Grund der methodischen Versuche zu erwarten wäre. Ob es sich hierbei um eine Wirkung des Ergotamin handelt oder ob hier lediglich der experimentelle Fehler sehr groß ausgefallen ist, läßt sich allein auf Grund der hier vorliegenden Ergebnisse nicht entscheiden.

Versuchsreihe 2:

Hier liegt für beide Teilversuchsreihen eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff+Hy' ase-Quaddel vor; aus dem Vorzeichen der Mittelwerts-Differenzen $\sigma_{\bar{x}}(t)$ ergibt sich, daß es sich hierbei um eine Hemmung der Hy' ase-Aktivität handelt. Die Größe der Mittelwertsdifferenzen $\sigma_{\bar{x}}(t)$ zeigt, daß die maximale Hemmung zum Zeitpunkt 15' p.i. auftritt; anschließend nimmt die Größe der Hy' ase-Hemmung stetig ab, um zum Zeitpunkt 60' p.i. den Wert 0 anzunehmen. Bei den Versuchsreihen mit Protaminsulfat ist die Experimentelle Variabilität sehr klein; auch hier kann nicht entschieden werden, ob es sich um einen ausschließlichen Einfluß der Substanz oder um eine Verbesserung in der Durchführung der experimentellen Technik handelt.

Versuchsreihe 3:

Bei dieser Versuchsreihe liegt ebenfalls für alle Teilversuchsreihen eine statistisch gesicherte Veränderung in der Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoff+Hy'ase-Quaddel vor; das Vorzeichen der Mittelwertsdifferenz $\delta \bar{x}(t)$ zeigt, daß es sich hierbei um eine Hy'ase-Hemmung handelt. Aus der Größe der Mittelwertsdifferenz $\delta \bar{x}(t)$ ergibt sich, daß das Maximum dieser Hemmung zum Zeitpunkt 15' p.i. liegt; anschließend nimmt die Größe der Hemmung stetig ab um den kleinsten beobachteten Wert zum Zeitpunkt 90' p.i. anzunehmen. Eine Sicherung dieser Hemmung der Hy'ase-Aktivität war zu sämtlichen Zeitpunkten der Versuchsreihe möglich. Auch bei dieser Versuchsreihe ist die experimentelle Variabilität sehr klein; sie bewegt sich in der gleichen Größe wie bei der Versuchsreihe 2.

ERGOTAMIN

15' und 60'

Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p.
Zwischen Tieren	3	3.826	1.275°2	100°00	0°1%
Zwischen Stufen	2	13	6°5	1°44	-
Rest-Varianz	6	27	4°5		
Gesamt-Varianz	11	3.866	351°4		

n = 2; $\chi^2_{emp.}$ = 0°003; 99 % < p.

Farbstoff + Hy' ase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p.
Zwischen Tieren	3	8.262	2.754°0	20°46	1%
Zwischen Stufen	2	2.607	1.303°5	9°68	5%
Zw. Kontr. u. V. Zeiten	1	1.617	1.617°0	12°01	5%
Zw. Versuchs-Zeiten	1	990	990°0	7°35	5%
Rest-Varianz	6	808	134°6		
Gesamt-Varianz	11	11.677	1.061°5		

n = 2; $\chi^2_{emp.}$ = 0°394; 8p % < p.

Tabelle 9

ERGOTAMIN

30' und 75'

Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p.
Zwischen Tieren	3	1.099	366°3	40°70	0°1 %
Zwischen Zeiten	2	8	4°0	-	
Rest-Varianz	6	54	9°0		
Gesamt-Varianz	11	1.161	105°5		

$n = 2; \chi^2_{emp.} = 0°884;\ 50\ \% < p.$

Farbstoff + Hy' ase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p.
Zwischen Tieren	3	9.861	3.287°0	6°88	5 %
Zwischen Stufen	2	642	321°0	-	
Rest-Varianz	6	2.865	477°5		
Gesamt-Varianz	11	13.368	1.215°3		

$n = 2; \chi^2_{emp.} = 0°521;\ 70\ \% < p.$

Tabelle 10

ERGOTAMIN

45' und 90'

Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p.
Zwischen Tieren	4	289	72°2	6°54	5 %
Zwischen Stufen	2	75	37°5	3°36	-
Rest-Varianz	8	89	11°1		
Gesamt-Varianz	14	435	32°4		

$n = 2; \chi^2_{emp.} = 0°127;$ 90 % $< p.$

Farbstoff + Hy'ase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p.
Zwischen Tieren	4	1.294	323°5	6°46	5 %
Zwischen Stufen	2	890	445°0	8°90	1 %
Zw. Kontrolle u. V. Zeiten	1	598	598°0	11°96	1 %
Zw. Versuchszeiten	1	292	292°0	5°84	5 %
Rest-Varianz	8	400	50°0		
Gesamt-Varianz	14	2.584	184°6		

$n = 2; \chi^2_{emp.} = 4°307;$ 10 % $< p.$

Tabelle 11

PROTAMINSULFAT

15' und 30'

Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p.
Zwischen Tieren	5	227	45°4	4°16	5 %
Zwischen Stufen	2	66	33°0	3°02	-
Rest-Varianz	10	109	10°9		
Gesamt-Varianz	17	402	23°6		

$n = 2; \chi^2_{emp.} = 5°857;\ 5\ \% < p.$

Farbstoff + Hy'ase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p.
Zwischen Tieren	5	3.717	743°4	100°00	0°1 %
Zwischen Stufen	2	3.315	1.657°5	100°00	0°1 %
Zw. Kontrolle u. V. Zeiten	1	2.952	2.952°0	100°00	0°1 %
Zw. Versuchszeiten	1	363	363°0	93°08	0°1 %
Rest-Varianz	10	39	3°9		
Gesamt-Varianz	17	7.071	415°9		

$n = 2; \chi^2_{emp.} = 0°017;\ 98\ \% < p.$

Tabelle 12

PROTAMINSULFAT

45' und 60'

Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p.
Zwischen Tieren	5	430	86°0	13°44	0°1 %
Zwischen Stufen	2	12	6°0	-	
Rest-Varianz	10	64	6°4		
Gesamt-Varianz	17	506	29°8		

$n = 2; \chi^2_{emp.} = 0°249;$ 80 % < p.

Farbstoff + Hy' ase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p.
Zwischen-Tieren	5	6.178	1.235°6	89°53	0°1%
Zwischen Stufen	2	553	276°5	20°03	0°1%
Zw. Kontrolle u. V. Zeiten	1	156	156°0	11°31	1 %
Zw. Versuchszeiten	1	397	397°0	28°77	0°1%
Rest-Varianz	10	138	13°8		
Gesamt-Varianz	17	6.869	404°1		

$n = 2; \chi^2_{emp.} = 0°403;$ 80 % < p.

Tabelle 13

AVIL

15' und 60'

Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p.
Zwischen Tieren	4	171	42°7	85°40	0°1 %
Zwischen Stufen	2	26	13°0	26°00	0°1 %
Zw. Kontrolle u. V. Zeiten	1	21	21°0	42°00	0°1 %
Zw. Versuchszeiten	1	5	5°0	10°00	5 %
Rest-Varianz	8	4	0°5		
Gesamt-Varianz	14	201	14°4		

n = 2; $\chi^2_{emp.}$ = 0°076; 95 % < p.

Farbstoff + Hy' ase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p.
Zwischen Tieren	4	138	34°5	2°24	-
Zwischen Stufen	2	20.741	10.370°5	100°00	0°1 %
Zw. Kontrolle u. V. Zeiten	1	19.051	19.051°0	100°00	0°1 %
Zw. Versuchszeiten	1	1.690	1.690°0	100°00	0°1 %
Rest-Varianz	8	123	15°4		
Gesamt-Varianz	14	21.002	1.500°1		

n = 2; $\chi^2_{emp.}$ = 6°653; 2 % < p.

Tabelle 14

AVIL

30' und 75'

Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p.
Zwischen Tieren	4	288	72°0	5°26	5 %
Zwischen Stufen	2	26	13°0	-	
Rest-Varianz	8	110	13°7		
Gesamt-Varianz	14	424	30°3		

n = 2; $\chi^2_{emp.}$ = 0°030; 98 % < p.

Farbstoff + Hy'ase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p.
Zwischen Tieren	4	1.005	251°2	19°78	0°1 %
Zwischen Stufen	2	11.594	5.797°0	100°00	0°1 %
Zw.Kontrolle u.V.Zeiten	1	9.223	9.223°0	100°00	0°1 %
Zw. Versuchszeiten	1	2.372	2.372°0	100°00	0°1 %
Rest-Varianz	8	102	12°7		
Gesamt-Varianz	14	12.701	907°2		

n = 2; $\chi^2_{emp.}$ = 0°254; 80 % < p.

Tabelle 15

AVIL

45' und 90'

Farbstoff-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p.
Zwischen Tieren	4	64	16°0	1°90	-
Zwischen Stufen	2	1	0°5	-	
Rest-Varianz	8	67	8°4		
Gesamt-Varianz	14	132	9°4		

n = 2; $\chi^2_{emp.}$ = 0°187; 90 % < p.

Farbstoff + Hy' ase-Quaddel

Varianz-Komponente	n	SAQ	MAQ	$F_{emp.}$	p.
Zwischen Tieren	4	99	24°7	2°94	-
Zwischen Stufen	2	11.041	5.520°5	100°00	0°1 %
Zw. Kontrolle u. V. Zeiten	1	6.631	6.631°0	100°00	0°1 %
Rest-Varianz	8	67	8°4		
Gesamt-Varianz	14	11.207	800°5		

n = 2; $\chi^2_{emp.}$ = 5°416; 5 % < p.

Tabelle 16

ERGOTAMIN

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	143	415			
H_v	255	631			
$E_{15'}$	140	427	- 3		-
$H_{15'}$	220	1.106	- 35	31° 5 %	1 %
$E_{60'}$	143	442	0		-
$H_{60'}$	242	1.286	- 13	11° 9 %	-

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	145	91			
H_v	253	1.465			
$E_{30'}$	144	137	- 1		-
$H_{30'}$	235	1.945	- 18	16° 5 %	-
$E_{75'}$	146	157	+ 1		-
$H_{75'}$	242	832	- 11	10° 2 %	-

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	146	29			
H_v	254	32			
$E_{45'}$	150	29	+ 4		-
$H_{45'}$	235	287	- 19	17° 6 %	1 %
$E_{90'}$	145	36	- 1		-
$H_{90'}$	246	104	- 8	7° 5 %	-

Tabelle 17

PROTAMINSULFAT

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	158	6			
H_v	280	260			
$E_{15'}$	153	50	- 5		-
$H_{15'}$	247	226	- 33	26°3 %	0°1 %
$E_{30'}$	155	11	- 3		-
$H_{30'}$	258	265	- 22	17°4 %	0°1 %

	$\bar{x}(t)$	$s^2(t)$	$\bar{x}(t) - \bar{x}(v)$	Hemmung	Sicherung
E_v	159	33			
H_v	276	392			
$E_{45'}$	157	28	- 2		-
$H_{45'}$	264	317	- 12	10°1 %	1 %
$E_{60'}$	157	37	- 2		-
$H_{60'}$	276	554	0	0°4 %	-

Tabelle 18

AVIL

	$\bar{x}$ (t)	s^2 (t)	$\bar{x}$ (t) - $\bar{x}$ (v)	Hemmung	Sicherung
E_V	147	13			
H_V	279	7			
$E_{15'}$	145	15	- 2		1 %
$H_{15'}$	190	5	- 89	66°1 %	0°1 %
$E_{60'}$	143	15	- 4		0°1 %
$H_{60'}$	216	53	- 63	46°7 %	0°1 %

	$\bar{x}$ (t)	s^2 (t)	$\bar{x}$ (t) - $\bar{x}$ (v)	Hemmung	Sicherung
E_V	152	41			
H_V	278	73			
$E_{30'}$	151	29	- 1		-
$H_{30'}$	210	118	- 68	53°3 %	0°1 %
$E_{75'}$	149	30	- 3		-
$H_{75'}$	241	86	- 37	29°2 %	0°1 %

	$\bar{x}$ (t)	s^2 (t)	$\bar{x}$ (t) - $\bar{x}$ (v)	Hemmung	Sicherung
E_V	148	9			
H_V	278	2			
$E_{45'}$	147	11	- 1		-
$H_{45'}$	213	29	- 65	50°2 %	0°1 %
$E_{90'}$	148	13	0		-
$H_{90'}$	255	11	- 23	18°0 %	0°1 %

Tabelle 19

DISKUSSION

Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, daß Ergotamintartrat, Protaminsulfat und das Antihistaminikum Avil, die in früheren Versuchen von Mathies und Mitarbeitern [13, 19-23] als die Hyaluronidasehemmung blockierend erkannt wurden, für sich allein eine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität bewirken. Mathies [10] hat zeigen können, daß hier kein Injektionsstreß vorliegen kann, da Injektionen von physiologischen Kochsalzlösungen keine Hemmung der Hyaluronidaseaktivität bewirken. Es ist vorläufig keine sichere Aussage darüber möglich, wie Substanzen, die die Hyaluronidasehemmung anderer Stoffe blockieren, selbst hyaluronidasehemmend wirksam sein können.

Nach Donzelot und Kaufmann [27] sowie Laborit und Hugenard [28] wirkt Ergotamintartrat mit Heparin synergistisch bezüglich einer Freisetzung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark. Nach Untersuchungen von Christophoris [18] scheint auch die Hyaluronidasehemmende Wirkung des Heparins in vivo zum Teil über eine Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark zu wirken. Inwieweit Ergotamin allein ohne Heparingabe eine katecholaminmobilisierende Wirkung besitzt, ist anscheinend nicht bekannt. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung des Ergotamintartrats durch eine Katecholaminausschüttung zu erklären ist, da Ergotamintartrat andererseits blockierend auf die Hyaluronidasehemmung des Adrenalins und des Noradrenalins wirkt.

Nach Smith [29] erscheint eine histaminmobilisierende Wirkung durch Adrenolytika möglich, so daß auch auf diesem Wege die hyaluronidasehemmende Wirkung des Ergotamins erklärt werden kann. Nach Kontis [17] wirkt Histamin in geringsten Dosen hyaluronidasehemmend. Allerdings wird auch die hyaluronidasehemmende Wirkung des Histamins durch Ergotamin blockiert.

Für unsere Befunde einer hyaluronidasehemmenden Wirkung des Protamins, das im übrigen die hyaluronidasehemmende Wirkung des Heparins blockiert, finden sich insofern Parallelen in der pharmakologischen Literatur, als Hougie [30] sowie Marbet, Studer und Winterstein [31] eine gerinnungshemmende Wirkung des Protaminsulfates beschreiben, während andererseits Protaminsulfat die gerinnungshemmende Wirkung des Heparins blockiert.

Nach Haas[32] sowie Konzett und Rothlin[33] setzen Antihistaminika Adrenalin frei. Nach Mathies[34] und Mitarbeitern[13, 31] wirkt Adrenalin bereits in geringen Dosen hyaluronidasehemmend, wobei der hyaluronidasehemmende Effekt des Adrenalins durch Avil nicht vollständig blockiert, sondern nur reduziert werden kann.

Somit finden sich für die Hyaluronidasehemmung des Ergotamins, Protaminsulfates und Avils zwar Erklärungsmöglichkeiten, jedoch sind diese nicht zu beweisen.

Zum mindesten kann nach den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit gesagt werden, daß es sich bei der Blockierung des hyaluronidasehemmenden Effektes entsprechend wirksamer Substanzen durch Gynergen, Protaminsulfat und Avil hier um einen echten blockierenden Effekt handelt, da sonst anzunehmen wäre, daß die Hemmung der Hyaluronidaseaktivität eher verstärkt werden müßte.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde mit einer auf dem Spreadingeffekt beruhenden Farbstoffhyaluronidasequaddelmethode im Rattenversuch gezeigt, daß das Adrenalytikum Ergotamintartrat, das heparininaktivierende Protaminsulfat und das Antihistaminikum Avil, die nach den vorliegenden Untersuchungen die Wirkung hyaluronidasehemmender Substanzen blockieren, selbst für sich allein einen hyaluronidasehemmenden Effekt besitzen. Erklärungen für dieses Verhalten werden diskutiert. Es wird angenommen, daß es sich bei der blockierenden Wirkung auf die Hyaluronidaseaktivität entsprechend wirksamer Substanzen um eine echte Blockade durch Ergotamintartrat, Protaminsulfat und Avil handelt, da sonst die Wirkung hyaluronidasehemmender Stoffe durch die genannten Substanzen eher verstärkt werden müßte.

LITERATURVERZEICHNIS

1.	Mathies H und Jankowski A.:	Klin. Wschr. 35 892/1957
2.	Mathies H.:	Arzneimittelforsch. 8, 233 (1958)
3.	Mathies H., Biechele I und Hartmann M.:	Ärztl. Forsch. XIV 160 (1960)
4.	Mathies H.:	Ztschr. ges. exp. Med. 13/118 (1959)
5.	Mathies H.:	Ztschr. Rheumaforsch. 18, 308 (1959)
6.	Mathies H. und Werther G.:	Ztschr. angew. Bäder Klimahk. 5 503 (1958)
7.	Mathies H.:	Med. Mschr. 12 791 (1957)
8.	Mathies H.:	Ztschr. Rheumaforsch. 18, 375 (1958)
9.	Mathies H. und v. Werther G.:	Ztschr. angew. Bäder Klimahk. 5 582 (1958)
10.	Mathies H.:	Ztschr. Rheumaforsch. 18 205 (1959)
11.	Domenjoz R.:	Arch. I. exper. Path. und Pharmako. 225 1955, 14
12.	Sayers G. und Sayers M.:	Endokrinology (Springfield) 40 (1947) 256
13.	Mathies H., Glück H. u. Poulantzos J. u. Schmidt D.:	Med. Exp. 1, 64 159
14.	Scheufele R.:	Diss. München 1958

15.	Mathies H. u. Schlierf G.:	Med. Exp. im Druck
16.	Mathies H.:	Verh. Dtsch. Ges. F. Inn. Med. 65 Kongreß 1959
17.	Kontis N.:	Diss. München in Vorbereitung
18.	Hristoforis A.:	Diss. München in Vorbereitung
19.	Maxein H.:	Diss. München 1959
20.	Vogel M.:	Diss. München in Vorbereitung
21.	Poulantzos J.:	Diss. München in 1958
22.	Glück A.:	Diss. München 1959
23.	Altheim G.:	Diss. München in Vorbereitung
24.	Wilhelmi G.:	Zit. Domenjoz (Nr. 11)
25.	Madinaveitia J.:	Biochemie J. 32 1806 (1938)
26.	Gibian H.:	Ergeb. d. Enzymf. 13 1 (1959)
27.	Donzelot E. und Kaufmann H.:	La Presse Medicale 76 1619 (1952)
28.	Laborit H. und Hugenard P.:	Zit. b. Adams-Ray: I. Int. Tg. Thromb. u. Emp. 1954
29.	Smitz M.:	J. of Pharmacol. 34, 239 (1928)
30.	Hougie C.:	Proc. Soc. Exper. Biol. Med. V. 98 (1958)
31.	Marbet R., Studer A., Winterstein A.:	I. Int. Tg. Thromb. u. Emb. (1954)

32.	Haas H.:	Histamine u. Antihistamine Editio Cantor K.G. 1952
33.	Konzett H. u. Rothlin E.:	Experientia Vol. IX/11 (1953)
34.	Mathies H.:	Arch. int. Pharmakodyn. A. Ther. CCXXIII 334 (1960)

Ich danke Herrn Professor Dr. W. Seitz für die Überlassung des Themas und Herrn Dr. H. Mathies für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit sowie Herrn Dipl. math. K. Liebrich für die statistischen Berechnungen.

LEBENSLAUF

Am 27.7.1935 wurde ich, Egbert Ingo Paul Loenicker, als Sohn des Dr. Wolfgang Loenicker und seiner Ehefrau Hedwig (geb. Lugscheider) in München geboren.

Im Jahre 1941 trat ich in die Volksschule in Töging am Inn ein. Von 1947 an besuchte ich die Oberrealschule in Mühldorf/Inn, dort legte ich 1956 meine Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1956/57 begann ich mein Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. 1962 legte ich im Anschluß an das WS 1961/62 mein medizinisches Staatsexamen ab.